

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah penelitian deskripsi eksploratif untuk mengidentifikasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair Tekstil di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Terpadu Cisirung, Dayeuh Kolot Bandung.

B. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah limbah cair tekstil di IPAL Terpadu Cisirung, Dayeuh Kolot Bandung, sampel adalah air limbah tekstil yang berada pada kolam kontak dan kolam stabilisasi karena di IPAL dalam proses pengolahan biologis menggunakan dua kolam yang berbeda, yaitu kolam kontak dan kolam stabilisasi. Sampling dilakukan pada kolam kontak dan kolam stabilisasi melalui tiga kali pengulangan dan sampel air diambil pada daerah tengah-tengah kolam.

C. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Terpadu Cisirung, Dayeuh kolot Bandung dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, Jl. Dr. Setiabudhi, No.229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Alat – Alat Penelitian

| No. | Alat-alat Laboratorium | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|--|------------------------------------|------------|
| 1. | Autoklaf | Merek EYELA model HL36AE | 1 unit |
| 2. | Mikroskop | 221.03 BLJ070 | 1 unit |
| 3. | <i>Rotary Shaker</i> | Merek EYELA model multi shaker MMS | 1 unit |
| 4. | Tips 1 ml, 5 ml, dan 10 ml | - | secukupnya |
| 5. | Oven dan Lemari Pendingin | Merek National | 1 unit |
| 6. | <i>Resiprocating water bath</i> | Merek EYELA | 1 unit |
| 7. | Neraca timbangan analitik | Merek AND | 1 unit |
| 8. | Vortek | Merek EYELA | 1 unit |
| 9. | Mikropipet 1 ml, dan 5 ml | Merek Eppendorf | 1 unit |
| 11. | Mikropipet 10 ml | Merek Eppendorf | 1 buah |
| 12. | Gelas Beker; labu erlenmeyer 100 ml, 250ml, 500 mL; labu ukur 100 mL; gelas ukur 25 mL, 100 mL, 500 ml; cawan Petri; tabung reaksi; tabung durham; jarum inokulasi; lampu spirtus; dan botol sampel 100 ml | Merek Pyrex | 50 buah |

Tabel 3.2. Bahan - bahan penelitian

| No | Bahan – bahan kimia | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1. | Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA) | Merek Merck (<i>pure analytic</i>) | secukupnya |
| 2. | Medium <i>Nutrient Broth</i> (NB) | - | secukupnya |
| 3. | Larutan lugol | - | secukupnya |
| 4. | Larutan safranin | - | Secukupnya |
| 5. | Larutan <i>crystal violet</i> | - | secukupnya |
| 6. | <i>Aluminium foil</i> | Merek Bagus | 2 Roll |
| 7. | Alkohol | 70 % | secukupnya |
| 8. | <i>Reagen</i> reduksi nitrat | - | secukupnya |
| 9. | <i>Reagen</i> uji katalase | - | secukupnya |
| 10. | <i>Reagen</i> hidrolisis pati | - | secukupnya |
| 11. | <i>Aquades</i> | - | 10 iter |

E. Pembuatan Media dan Sterilisasi

Pembuatan media dan larutan yang diperlukan mengikuti acuan yang diambil dari beberapa pedoman, yaitu Mckane (1996) dan Syulasma *et al.*, (2008). Medium yang diperlukan dalam penelitian ini, meliputi *Nutrient Agar* (NA) untuk pembiakan bakteri, *Nutrient Broth* (NB) untuk kultivasi bakteri, medium kaldu laktosa, sukrosa, dan dekstrosa untuk fermentasi karbohidrat, nitrate broth untuk reduksi nitrat, pati agar untuk hidrolisis pati, lipid agar untuk hidrolisis lipid, gelatin agar untuk hidrolisis gelatin, kasein agar untuk hidrolisis kasein. Setelah pembuatan medium selesai dilakukan, selanjutnya medium disterilisasi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi. Lamanya waktu sterilisasi berkisar antara 15 menit sampai 30 menit dengan menggunakan autoklaf 121° C pada tekanan 1,5 atm.

1. Medium *Nutrient Agar* (NA)

Komposisi medium *Nutrient Agar* (NA) terdiri dari tepung agar 15 gram, pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef ekstrak* 3 gram. Lalu semua bahan tersebut dilarutkan dengan *aquades* dalam *beaker glass* sambil diaduk, dan volume digenapkan menjadi 1000 ml. diatur pH medium yang berkisar antara 6,8-7,2, dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen. Selanjutnya disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

2. Medium *Nutrient Broth* (NB) Termodifikasi

Komposisi medium *Nutrient Broth* (NB) terdiri dari pepton 10 gram, NaCl 5 gram, *beef ekstrak* 3 gram. Semua bahan tersebut dilarutkan dengan *aquades*

sebanyak 500 ml dalam *beaker glass* sambil diaduk, dan volume digenapkan menjadi 1000 ml dengan air limbah tekstil. Diatur pH yang berkisar antara 6,8-7,2 dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen. Selanjutnya disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm. Medium ini akan digunakan untuk menyeleksi keberadaan bakteri aerob dari hasil pertumbuhan koloni bakteri. Pada medium NB, 50 % volume aquades diganti oleh air limbah sebagai media adaptasi bagi bakteri.

3. Medium Kaldu Laktosa

Komposisi medium kaldu laktosa terdiri dari pepton 5 gram, NaCl 5 gram, *beef extract* 3 gram, laktosa 5 gram, dan brom cressol purple (bcp) 0,01 gram. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan *aquades* sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya diatur pH yang berkisar antara 7-7,2 dan disterilkan pada autoklaf 121° C dalam tekanan 1,5 atm.

4. Medium Kaldu Dekstrosa

Komposisi medium kaldu dekstrosa terdiri dari pepton 5 gram, NaCl 5 gram, *beef extract* 3 gram, dekstrosa 5 gram, dan brom cressol purple (bcp) 0,01 gram. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan *aquades* sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya diatur pH yang berkisar antara 7-7,2 dan disterilkan pada autoklaf 121 °C dalam tekanan 1,5 atm.

5. Medium Kaldu Sukrosa

Komposisi medium Kaldu sukrosa terdiri dari pepton 5 gram, NaCl 5 gram, *beef ekstrak* 3 gram, sukrosa 5 gram, dan brom cressol purple (bcp) 0,01 gram. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan *aquades* sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya diatur pH yang berkisar antara 7-7,2 dan disterilkan pada autoklaf 121° C dalam tekanan 1,5 atm.

6. Medium Pati

Komposisi medium pati terdiri dari pepton 5 gram, *beef ekstrak* 3 gram, amilum 2 gram, dan agar 15 gram. Semua bahan dicampurkan sampai homogen dengan ditambahkan *aquades* dan volumenya mencapai 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya diatur pH yang berkisar antara 7-7,2 dan disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

7. Medium Lipid

Komposisi medium lipid terdiri dari Pepton 5 gram, *beef ekstrak* 3 gram, agar 15 gram, lipid 10 gram, dan *neutral red* 0,02 gam. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan *aquades* hingga volumenya mencapai 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan sampai mendidih. Selanjutnya diatur pH yang berkisar antara 7-7,2 dan disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

8. Medium Gelatin

Komposisi medium gelatin terdiri dari pepton 5 gram, *beef extract* 3 gram, dan gelatin 120 gram. Semua bahan dicampurkan hingga homogen dengan ditambahkan *aquades* sampai volumenya 1000 ml dalam penangas air dan dibiarkan hingga mendidih. Selanjutnya diatur pH hingga 6,8 dan disterilkan pada autoklaf 121° C pada tekanan 1,5 atm.

9. Medium Kasein

Komposisi medium kasein terdiri dari pepton 5 gram dan agar powder 15 gram. Semua bahan dicampurkan dengan *aquades* 1000 ml, lalu dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Tuangkan campuran tadi ke dalam gelas kimia yang berisi 100 gram susu skim powder perlahan sedikit demi sedikit agar tidak terjadi penggumpalan lalu diaduk hingga homogen. Selanjutnya diatur pH hingga 7,2 dan medium dimasukkan ke setiap tabung reaksi sebanyak 12-15 ml. Kemudian medium disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

10. Medium Uji Katalase

Komposisi medium uji katalase terdiri dari tepung agar 15 gram, pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram. Semua bahan dilarutkan dengan *aquades* dalam beaker glass sambil diaduk, volume digenapkan menjadi 1000 ml. selanjutnya pH diatur yang berkisar antara 6,8-7,2, dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen. Selanjutnya medium dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak

5 – 7 ml untuk agar miring dan disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

11. Medium Uji Reduksi Nitrat

Komposisi medium uji reduksi nitrat terdiri dari disodium fosfat 2 gram, 20 gram tripton, 1 gram dekstrosa, 1 gram agar, dan 1 gram potasium nitrat. Semua bahan dilarutkan dengan *aquades* dalam *beaker glass* sambil diaduk, volume digenapkan menjadi 1000 ml. selanjutnya diatur pH hingga 7,2, dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen. Kemudian medium dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 8-10 ml dan disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

12. Medium Uji Kebutuhan Oksigen (NA diri)

Komposisi medium *Nutrient Agar* (NA) terdiri dari tepung agar 15 gram, pepton 10 gram, NaCl 5 gram, dan *beef extract* 3 gram. Lalu semua bahan tersebut dilarutkan dengan *aquades* dalam *beaker glass* sambil diaduk, dan volume digenapkan menjadi 1000 ml. diatur pH medium yang berkisar antara 6,8-7,2, dan dibiarkan hingga mendidih serta homogen. Selanjutnya disterilkan pada autoklaf 121° C dengan tekanan 1,5 atm.

13. Pembuatan Reagen Pewarnaan Gram Bakteri

Komposisi medium reagen uji pewarnaan Gram terdiri dari kristal violet 2 gram dilarutkan dalam 20 ml ethanol 95%, dan ditambahkan *ammonium oxalate*

0,8 gram yang dilarutkan dengan *aquades* 80 ml. Dalam membuat lugol, kristal iodium 0,06 gram ditambahkan dengan 0,12 gram Kristal KI dan 20 ml *aquades*. Selain itu, alkohol 96 %, dan pembuatan safranin O dengan melarutkan 125 mg dalam larutan 5 ml ethanol 95% dan *aquades* 50 ml. Beberapa larutan tersebut dimasukkan dalam botol gelap dan diberi label sesuai ketentuan.

14. Pembuatan H₂O₂ 3%

Sebanyak 3 ml H₂O₂ diencerkan dengan *aquades* menjadi 10 ml, kemudian dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap. Diberi label sesuai ketentuan.

15. Pembuatan Reagen Uji Reduksi Nitrat

Komposisi medium reagen uji reduksi nitrat terdiri dari Asam sulfanilat 8 gram dilarutkan dalam 1000 ml asam asetat, larutan ini sebagai larutan A. Kemudian 5 gram *alpha-naphtylamine* dilarutkan dalam 1000 ml asam asetat 5 N, larutan ini sebagai larutan B. Selain larutan A dan larutan B, 10 gram *Zinc powder* digunakan untuk identifikasi reaksi reduksi nitrat menjadi nitrat oleh bakteri.

16. Pembuatan Reagen Uji Hidrolisis Pati (Larutan Lugol)

Komposisi medium reagen uji hidrolisis pati terdiri dari kristal iodium 0,06 gram ditambahkan dengan 0,12 gram Kristal KI dan 20 ml *aquades*. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan dalam botol gelap dan diberi label sesuai ketentuan.

F. Langkah Kerja

Adapun prosedur kerja yang dilakukan dalam setiap kegiatan adalah sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan

Dalam tahap persiapan, yang dilakukan adalah pengecekan alat dan bahan yang digunakan selama penelitian. Setelah lengkap semua kebutuhan penelitian, maka dilakukan sterilisasi botol sampel, *beaker glass*, labu Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, cawan Petri, dan tabung reaksi serta peralatan lain yang harus disterilisasi untuk menghindari kontaminasi. Setelah sterilisasi selesai, maka dilakukan pembuatan medium NA untuk menumbuhkan isolat bakteri dari limbah cair tekstil. Tiap tabung reaksi masing-masing berisi 5-7 ml medium NA untuk agar miring sebanyak 50 tabung, tabung reaksi diisi 12-15 ml medium NA untuk pertumbuhan bakteri melalui cawan tuang, sedangkan untuk medium *Nutrient Broth* (NB) termodifikasi tiap labu Erlenmeyer berisi 25-30 ml medium NB sebanyak 6 buah dan semua medium disterilkan.

2. Tahap Penelitian

Dalam tahap penelitian ini, dilakukan beberapa kegiatan yaitu pengambilan sampel dan isolasi bakteri dari limbah, isolasi biakan murni bakteri, dan identifikasi atau karakterisasi bakteri limbah cair tekstil di IPAL Cisirung, Dayeuh Kolot Bandung.

a. Pengambilan Sampel Bakteri dari Limbah Cair Tekstil

Sampling air limbah dilakukan pada pagi hari sebanyak tiga kali selama penelitian di dua kolam yang berbeda, yaitu kolam kontak dan kolam stabilisasi. Sebelum melakukan sampling air, akan diamati dahulu faktor aquatik yaitu suhu, pH, turbiditas, dan kadar DO. Sampel air limbah yang diambil sebanyak 100 ml, masukkan ke dalam botol gelap 250 ml steril kemudian sampel air dibawa ke laboratorium untuk diinokulasikan pada medium NB termodifikasi untuk diketahui jenis koloni bakteri yang ada pada limbah cair tekstil.

Pembuatan medium modifikasi diharapkan dapat menunjang pertumbuhan bakteri yang diinginkan, sehingga dibuat medium NB dengan melakukan modifikasi medium melalui penggantian 50% volume aquades dari total kebutuhan dengan air limbah cair tekstil steril sebagai media adaptasi atau selektif dengan komponen zat terlarut dalam pertumbuhan bakteri yang diharapkan dapat ditemukan bakteri yang diharapkan. Medium NB dimasukkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml dengan volume 30 ml sebanyak 6 buah untuk kolam kontak I, IV, dan VI serta kolam stabilisasi I, IV, dan VI. Labu erlenmeyer tersebut kemudian ditutup dengan sumbat kapas dan kasa serta ditutup dengan *aluminium foil* pada bagian luar sumbat labu.

Setelah medium selesai dibuat, maka dilakukan sterilisasi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi yang berpengaruh terhadap pertumbuhan koloni bakteri. Setelah sterilisasi selesai maka dilakukan pengenceran air limbah cair tekstil yang akan ditumbuhkan pada medium NB termodifikasi.

Proses pengenceran dilakukan dengan menyiapkan air limbah yang berada pada botol jam gelap volume 250 ml dari 6 sumber kolam pada IPAL yaitu kolam kontak I, IV, dan VI serta kolam stabilisasi I, IV, dan VI. Lima tabung reaksi berisi 9 ml *aquades* steril disiapkan untuk proses pengenceran dari mulai pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} , dengan cara diambil 1 ml air limbah dari salah satu botol sumber air limbah kolam kontak/stabilisasi dengan tips steril 1 ml melalui mikropipet 1 ml, masukkan ke dalam tabung reaksi 10^{-1} dan dilakukan seterusnya hingga pengenceran 10^{-5} kemudian ambil 1 ml dari hasil pengenceran 10^{-5} yang dimasukkan dalam labu erlenmeyer yang berisi medium NB.

Pengenceran dilakukan secara aseptik dan adanya proses homogenisasi melalui vortek. Medium NB berisi isolat limbah hasil pengenceran siap dikultivasi pada kecepatan 121 rpm selama 2 x 24 jam pada suhu kamar melalui *rotary shaker*. Selama proses kultivasi bakteri, disiapkan medium NA dalam tabung reaksi untuk menumbuhkan koloni hasil kultivasi. Setelah masa kultivasi bakteri selesai, maka dilakukan pembuatan kultur bakteri hasil kultivasi melalui metode cawan tuang dengan cara memasukkan 1 ml medium NB ke dalam cawan Petri steril dan dihomogenkan dengan cara diputar membentuk angka 8 pada permukaan dalam kotak isolasi. Kemudian dimasukkan NA cair suhu 37°C ke dalam cawan Petri yang berisi medium NB 1 ml, dihomogenkan dengan cara memutar cawan Petri membentuk angka 8 dan didinginkan hingga agar membeku. Cara di atas dilakukan untuk beberapa sampel hasil kultivasi dari air kolam lainnya dan cawan Petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator suhu 30°C

selama 24 jam dan diamati koloni yang terbentuk dalam setiap cawan petri dari setiap kolam yang diamati melalui *colony counter*.

b. Isolasi Biakan Murni Bakteri Hasil Kultivasi

Koloni bakteri yang tumbuh pada cawan Petri hasil kultivasi merupakan biakan umum yang hidup pada air limbah cair tekstil. Setiap koloni diambil 1 ose yang ditumbuhkan pada medium NA miring agar dihasilkan biakan murni sehingga memudahkan tahap identifikasi selanjutnya. Proses ini diulang untuk beberapa kali dalam peremajaan kultur. Diamati koloni yang terbentuk setelah masa inkubasi 24 jam pada temperatur 30 °C. Diamati pertumbuhannya dan bakteri siap dikarakterisasi menggunakan pewarnaan Gram dan uji biokimia.

c. Tahap Identifikasi atau Karakterisasi Bakteri

Dalam tahap akhir ini, langkah penelitian yang dilakukan yaitu pewarnaan Gram dan uji aktivitas biokimia sebagai tahap utama dalam identifikasi bakteri aerob yang ditemukan dalam air limbah tekstil. Identifikasi dilakukan dengan berbagai macam metode, yaitu membuat preparat dengan metode pewarnaan Gram dan melakukan uji aktivitas biokimia terhadap bakteri hasil isolasi limbah (Nicklin *et al.*, 1999; Kusnadi *et al.*, 2003; Syarif, 2005). Tahap identifikasi atau karakterisasi dalam penelitian ini meliputi: pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dan uji aktivitas biokimia bakteri.

1) Pembuatan Preparat dengan Metode Pewarnaan Gram

Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan Gram dilakukan melalui dua tahap yaitu membuat olesan bakteri dan melakukan pewarnaan Gram terhadap olesan bakteri.

a) Membuat Olesan Bakteri

Membersihkan obyek gelas hingga bebas lemak dengan kapas beralkohol, lalu ditetaskan *aquades* dengan menggunakan pipet tetes pada obyek gelas dan diambil 1 ose biakan murni bakteri dari air limbah cair tekstil dengan jarum inokulasi yang sebelumnya telah dipijarkan. Disebarkan *suspense* tersebut sehingga menjadi sediaan tipis dalam bentuk lingkaran dengan garis tengah ± 2 cm dan dikeringkan sediaan tersebut di udara lalu difiksasi dengan cara dilewatkan pada api sebanyak tiga kali.

b) Melakukan pewarnaan terhadap olesan bakteri

Olesan bakteri yang telah difiksasi, dituangi larutan pewarna karbol kristal violet dan didiamkan selama 3 menit. Selanjutnya kelebihan zat warna dibuang dan ditambahkan larutan lugol, dibiarkan selama 45-60 detik. Dimasukkan sediaan bakteri ke dalam larutan *alcohol* 96% dalam beker gelas yang digoyang-goyang selama 1 menit, lalu dibilas sediaan tersebut dengan botol semprot dan dikeringkan olesan tersebut dengan kertas isap. Ditambahkan larutan safranin O dan dibiarkan selama 3 menit, kemudian dicuci dengan *aquades* dalam botol semprot dan dikeringkan di udara dan ditutup dengan *cover glass* yang sebelumnya sediaan tersebut ditetesi minyak imersi. Sediaan tersebut diamati

di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa obyektif 100x. Apabila warna koloni bakteri menunjukkan merah maka bakteri tersebut tergolong bakteri Gram negatif, dan jika menunjukkan warna biru/ungu maka tergolong kelompok bakteri Gram positif.

2) Uji Aktivitas Biokimia Bakteri Limbah Cair Tekstil

Pengujian aktivitas biokimia dilakukan terhadap kultur murni bakteri yang terbagi menjadi 2 tahap yaitu tes primer dan tes sekunder. Tes primer meliputi reaksi gram, spora, motilitas, kondisi aerob, anaerob, katalase, oksidasi, fermentasi, dan tes glukosa. Sedangkan tes sekunder meliputi tes karbohidrat, urease, indol, dan reduksi nitrat (Cowan, 1974). Uji aktivitas biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji fermentasi karbohidrat, hidrolisis pati, hidrolisis lipid, hidrolisis gelatin, hidrolisis kasein, tes katalase, reduksi nitrat, dan uji kebutuhan oksigen.

a) Uji Fermentasi Karbohidrat

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam 1 tabung reaksi yang berisi medium *fenol red* laktosa dan tabung Durham, 1 tabung reaksi berisi medium *fenol red* sukrosa dan tabung Durham, dan 1 tabung reaksi berisi medium *fenol red* dekstrosa dan tabung Durham. Semuanya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C, lalu dilakukan pengamatan ada tidaknya gelembung udara pada tabung Durham.

b) Uji Hidrolisis Pati

Menginkubasikan bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam cawan Petri berisi medium agar pati selama 24 jam pada suhu 37°C , setelah terlihat adanya pertumbuhan maka kultur tersebut dituangi dengan larutan lugol dan dibiarkan selama beberapa menit. Diamati perubahan warna yang terjadi pada sekitar koloni.

c) Uji Hidrolisis Lipid

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam cawan Petri berisi medium agar lipid dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , lalu diamati penampakan koloni pada sekitar medium.

d) Uji Hidrolisis Gelatin

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam tabung reaksi yang berisi medium *nutrient* gelatin dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , kemudian disimpan pada inkubator dengan suhu 4°C selama 30 menit. Diamati cair tidaknya medium.

e) Uji Hidrolisis Kasein

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam cawan Petri yang berisi medium agar kasein dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Diamati perubahan warna yang terjadi di sekitar medium.

f) Tes Katalase

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam tabung reaksi yang berisi 7 ml medium NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C, kemudian ditetesi H₂O₂ 3%. Diamati ada tidaknya gelembung udara di atas permukaan kultur bakteri.

g) Uji Reduksi Nitrat

Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam tabung yang berisi medium kaldu nitrat dengan memberi label tabung nama mikroorganisme tersebut. Dengan tehnik sterilisasi, dilakukan inokulasi mikroorganisme pada tabung medium nitrat, lalu diinkubasikan pada suhu 22-37° C selama 1-2 X 24 jam. Kemudian ditetesi 3-4 tetes larutan nitrat A dan larutan nitrat B di atas permukaan kultur, didiamkan beberapa menit dan amati perubahan yang terjadi. Perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry* menunjukkan reaksi positif uji reduksi nitrat. Untuk medium yang tidak mengalami perubahan warna, selanjutnya ditambahkan *zinc powder* secukupnya, dan diamati perubahan yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna medium putih kekuningan menjadi merah *cherry*, maka reaksi menunjukkan negatif dan bila tidak menunjukkan perubahan warna, maka reaksi menunjukkan positif dalam uji reduksi nitrat.

h) Uji Kebutuhan Oksigen (Aerob/Anaerob)

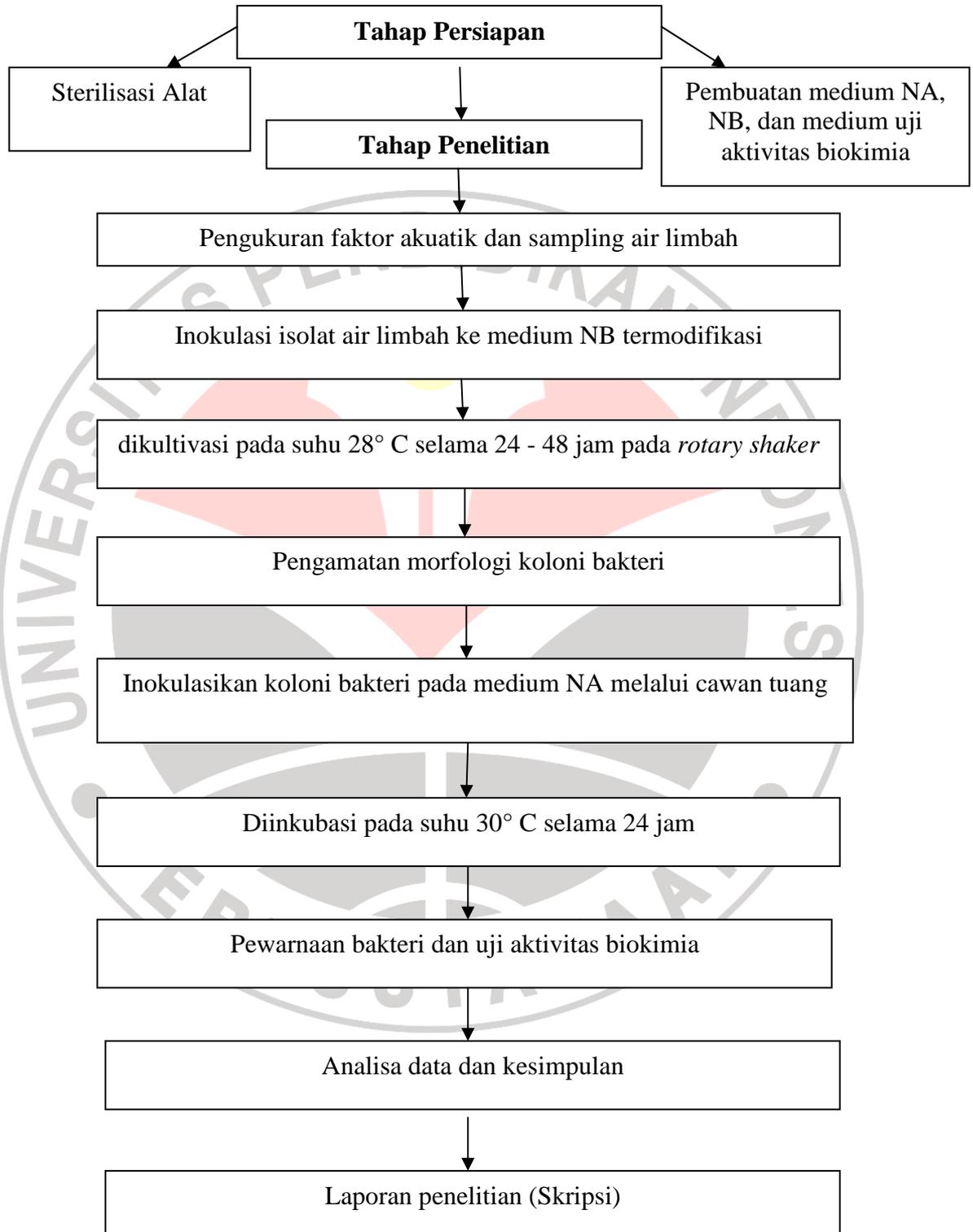
Menginokulasi bakteri yang diisolasi dari limbah cair tekstil dalam tabung yang berisi medium kaldu nutrisi Agar dan diberi label tabung berisi agar diri NA dengan nama mikroorganisme. Dicairkan medium NA, diturunkan suhunya hingga 45°C, lalu dengan tehnik sterilisasi, dilakukan inokulasi mikroorganisme. Kemudian kultur dikocok dengan hati-hati menggunakan telapak tangan, hindari terbentuknya gelembung udara. Didinginkan dengan cepat dalam *waterbatch* dengan posisi tegak dan sumbat kapas ditekan sampai jarak 2 cm dari mulut tabung dan dituangkan sedikit paraffin cair di atas sumbat kapas. Lalu, diinkubasikan pada suhu 22-37° C selama 1-2 x 24 jam dan diamati distribusi pertumbuhan mikroorganisme dalam kultur apakah di dasar atau di atas permukaan kultur.

G. Analisis Data

Setelah sampling air limbah selesai dilakukan dan dihasilkan kultur bakteri biakan murni pada medium agar miring, maka kultur bakteri dari air limbah tekstil akan diidentifikasi melalui reaksi pewarnaan Gram dan uji biokimia agar diketahui karakteristik bakteri aerob limbah cair tekstil sebagai tahap identifikasi yang diharapkan. Hasil identifikasi bakteri melalui pewarnaan Gram dan uji aktivitas biokimia selanjutnya dikaitkan dengan data hasil faktor aquatik dari lokasi pengambilan sampel air limbah.

H. Alur Penelitian

Bagan alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1. di bawah ini:



Gambar. 3.1. Bagan alir penelitian